



*The Hong Kong University of Science and Technology
Shenzhen Centre for Chinese Medicine R & D
Tel: 0755-86715683*

角豆樹果莢中の天然小分子化合物角豆樹素Aと活性評
価研究



Project held by:

Center for Chinese Medicine R & D

**The Hong Kong University of Science and
Technology**

香港科学技術大学漢方薬研究開発センター

Jul.23, 2020





1 実験目的

LC-MS/MSをガイドとして角豆樹果莢中の天然小分子化学成分を系統的に分離し、ポピー解析と構造鑑別を行う、分離して得られた新規化合物をinvitro活性評価し、特定の活性を有する新規化合物をスクリーニングした。

2 材料と機器

2.1 ざいりょう

薬剤：マメ科長マメ科植物角マメの木（ラテン学名：Ceratonia siliqua Linn.）乾燥した莢。角豆樹果莢は2018年8月にヨーロッパから採取され、香港科学技術大学深セン研究院漢方薬研究開発センターに保管されている。

2.2 きぐ

AVANCE III 600 MHz超伝導核磁気共鳴分光器（スイスBruker社）、maXis impact高分解能電気噴霧四段ロッド飛行時間質量分析計（米国Bruker Daltonics社）、漢邦科技半調製液相（NP 7005 C液相輸液ポンプ、NU 3000 C紫外可変波長検出器、EasyChrom-1000ワークステーション、中国漢邦科技有限公司）、Waters 2695高効率液体クロマトグラフィー（米国Waters社）、Nexus 4 70 Fourier赤外分光器（米国サーモックス社）、UV-24 01 PC紫外可視分光光度計（島津ジャパン）、ZF-1型三用紫外線分析器（江蘇海門市其林貝耳計器製造有限公司）、電気ジャケットAdam SAB 225 i半微量分析天秤（Max 220 g、d=0.01 mg、英Adam社）、Merck Direct-Q超純水システム（ドイツMerck Millipore社）、DLSB-5/20低温冷却液循環ポンプ（鄭州長城科工貿有限公司）、回転蒸発器（スイスBUCHI社）、DZF-6020真空乾燥箱（上海一恒科学計器有限公司）。

2.3 しやく

石油エーテル（広東光華科学技術有限公司、Lot.No.20180905）、ジクロロメタン（西隴科学株式会社、Lot.No.190411）、酢酸エチル（天津市永大化学試薬有限公司、Lot.No.20170309）、エタノール（西隴科学株式会社、



The Hong Kong University of Science and Technology
Shenzhen Centre for Chinese Medicine R & D
Tel: 0755-86715683

Lot.No.191109) 、メタノール (西隴科学株式会社、Lot.No.191109) など
はすべて分析純である、HPLC級メタノール (ドイツMerck社) 、超純水
(Merck Direct-Q超純水システム) 。



3 クマリン分離精製

角豆樹果莢粗粉20.0 kgを秤量し、7倍重量部の95%エタノール還流を加えて2回（毎回1.5 h）抽出し、さらに7倍重量部の70%エタノール還流で1回（1.5 h）抽出し、合併後溶媒を回収してエキス12.4 kgを得た。エキスを1~10倍重量部の水で分散した後、大孔吸着樹脂D 101を経て吸着し、蒸留水で3つのカラム体積を溶出して糖類などの不純物を除去し、さらに95%エタノールで3つのカラム体積を溶出し、溶媒を回収した後、非糖類小分子部位462.7 gを得た。得られた非糖類小分子部位を1.0 L 50%メタノールで分散し、石油エーテル、酢酸エチルを順次用いてそれぞれ5回抽出し、溶媒を回収した後、石油エーテル部位28.4 g、酢酸エチル部位139.4 g、水部位290.2 gをそれぞれ得た。

酢酸エチル部位135.0 gを秤量し、シリカゲル（200~300目）カラムクロマトグラフィーにより分離し、石油エーテル（P）-酢酸エチル（E）、ジクロロメタン（C）-メタノール（M）の2つの溶出システムを用いて108個の流分を得、TLC薄層検査により、成分類似流分を合併し、10個の流分（Fr.A~J）を得た。流分Fr.F（8.5 g）はODSカラムクロマトグラフィー、メタノール-水（15 : 85→100 : 0）勾配を経て溶出し、得られた流分はTLC検査を経て合併し、6つの流分（Fr.F 1~F 6）を得た。Fr.F 4（4.2 g）をSephadex LH-20カラムクロマトグラフィーにより分離し、ジクロロメタン-メタノール（1 : 1）を溶出し、5つの流分（Fr.F 4 a~F 4 e）。Fr.F 4 c（1.1 g）を半調製液相（カラムI、メタノール : 水 = 40 : 60、吸収波長217 nm）で分離し、3つの流分（Fr.F 4 c 1~Fr.F 4 c 3）を得た。Fr.F 4 c 2は、半調製液相（カラムII、メタノール : 水 = 36 : 64、吸収波長217 nm）により精製され、クマリンA



(23.8 mg、tR=37.14 min) を得た。4角豆樹素A構造解析

この化合物は黄色粉末であり、負イオンモードHR-ESI-MSはエキシマイオンピークm/z 507.1180 [M-H]⁻を与え、この化合物の分子式C₂₃H₂₄O₁₃を推定し、不飽和度を12と計算した。赤外線データによると(図1)、分子構造中に水酸基(3378.33 cm⁻¹)、芳香環(1603.89、151.90 cm⁻¹)及びエステル結合(1699.52、1214.57 cm⁻¹)などの官能基が含まれている。1HNMR(図

2)トランスオレフィンプロトン信号のセットが観察された[δ H 7.62 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7), 6.39 (1H, d, J

= 15.6 Hz, H-8)], 一組ベンゼン環 ABX 系統信号[δ H 7.18 (1H, s, H-2), 7.06 (1H, d, J = 7.8

Hz, H-6), 6.80 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-5)], 1,3,4,5-置換ベンゼン環水素信号[δ H 7.14 (2H,

s, H-2', 6'), メトキシ信号[δ H 3.88 (3H, s, OCH₃-3)], グルコース残基水素信号のセット[δ H 5.68 (1H, d, J = 5.4 Hz, H-1''), 4.52 (1H, d, J = 11.4 Hz, H-6''), 4.31 (1H,

m, H-6''), 3.70 (1H, m, H-5''), 3.51 (2H, m, H-2'', 3''), 3.46 (1H, m, H-4'')]



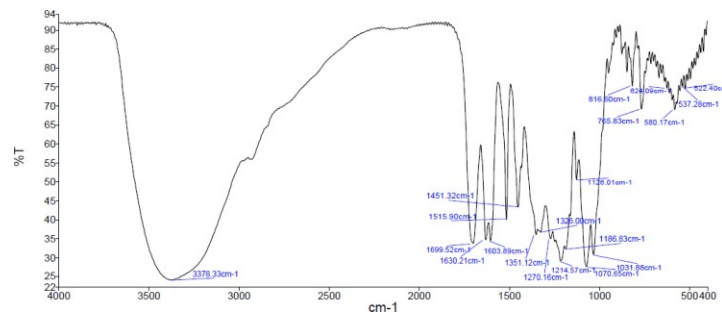
^{13}C NMR (図3) において、2つのエステルカルボニル炭素信号 (δ 169.1,

166.9)、14個の芳香族炭素またはオレフィン炭素信号 (δ C 150.6, 149.3, 147.2, 146.5 \times 2, 140.4, 127.7,

124.2, 120.6, 116.4, 115.2, 111.6, 110.6 \times 2), 1個のメトキシカーボン信号 (δ C 56.4)、グルコ
群

グルコース残基炭素信号 (δ C 95.9, 78.0, 76.3, 74.1, 71.3, 64.4)。以上の分析
と文献対を総合する

比を用いて、この化合物はグルコース残基1個、フェルラ酸1個、没食子酸構造



単位1個を組み合わせたものと推定される。

図1クマリンAのIRスペクトル

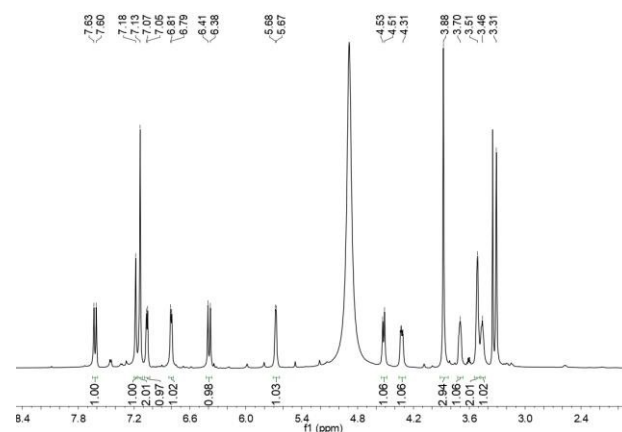


図2クマリンAの ^1H NMRスペクトル (CD $_3$ OD, 600MHz)

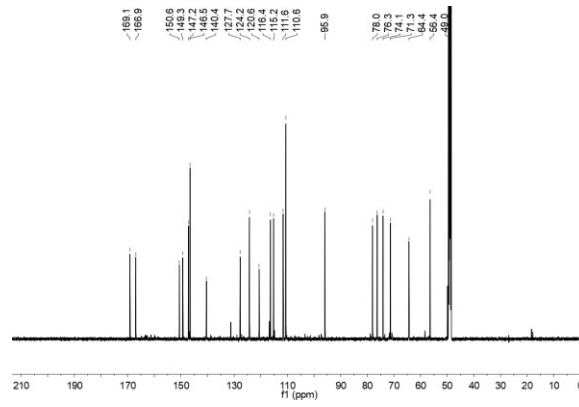


図3クマリンAの¹³CNMR (CD₃OD, 150MHz)



HMBCスペクトル (図4-8) において、H-2とC-4/C-6、H-5とC-1/C-3、
H-6とC-4、H-7とC-2/C-6/C-9、H-8とC-1、OCH₃-3とC-3に遠隔相関信
号が観察され、この化合物の構造中に魏酸構造単位の推定が存在するを証明し
た。さらに、H-2'、6'及びC-4'/C-3'

/C-5' /C-7'の遠隔相関信号も、化合物の構造中に没食子酸構造単位の推定が存在
することを証明している。HMBCスペクトルでは H-6''及びC-9''にも遠隔相関信号が観察
され、フェルラ酸はエステル結合を介してグルコース残基のC-6''と結合し、H-1''及びC-7''の
遠隔相関信号は没食子酸がエステル結合を介してグルコース残基の末端基炭素と結合し
ていることを示している。グルコース末端基陽子のカップリング定数は4 Hzである
Hzは、グルコースの末端基の相対配置がαを選択して設定できます。したがって、この化合
物の構造を同定することは、図9に示すように、クマリンAと命名される。

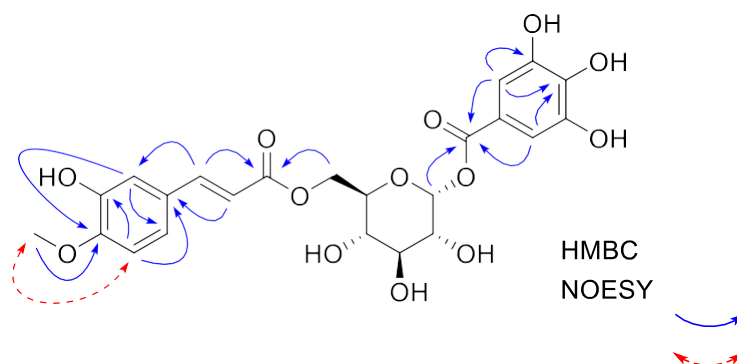
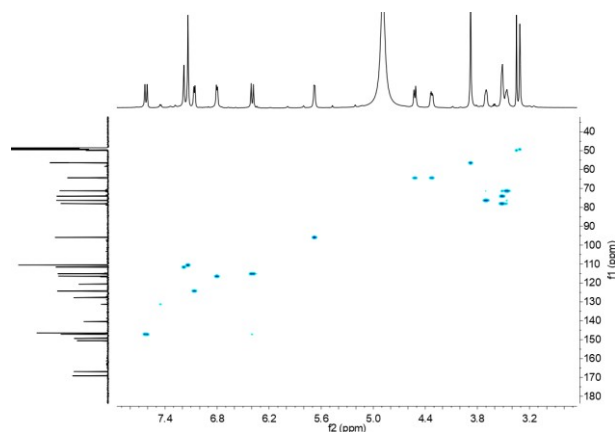


図4角豆樹素Aの主要HMBCとNOESY相関図





The Hong Kong University of Science and Technology
Shenzhen Centre for Chinese Medicine R & D
Tel: 0755-86715683

図5角豆樹素AのHSQCスペクトル

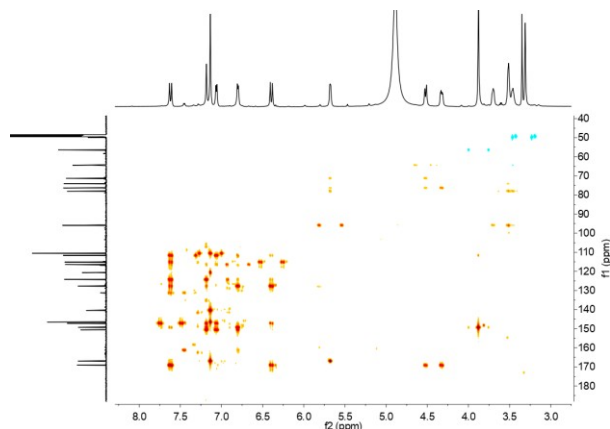


図6クマリンAのHMBCスペクトル

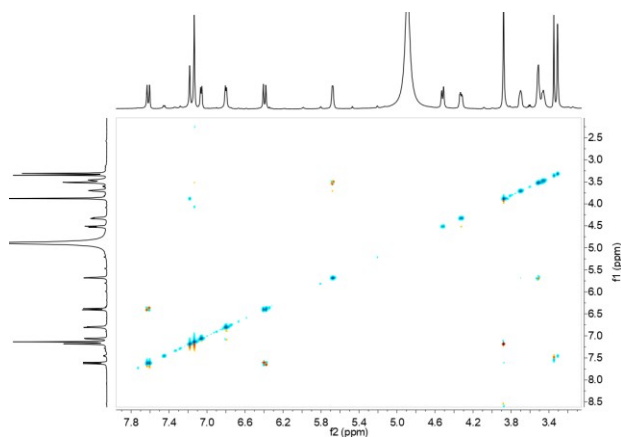


図7クマリンAのNOESYスペクトル

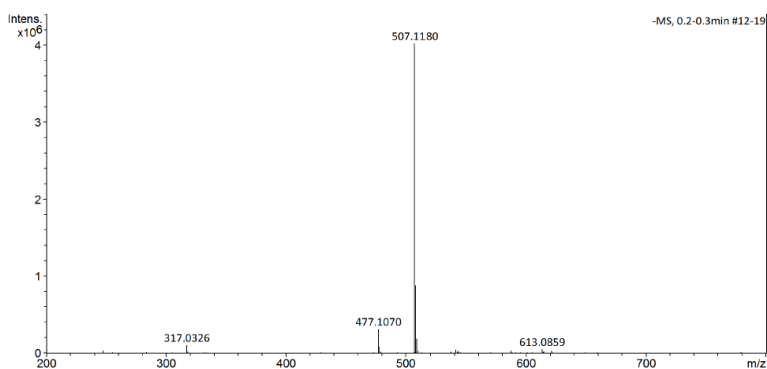


図8角豆樹素A高分解能質量分析図

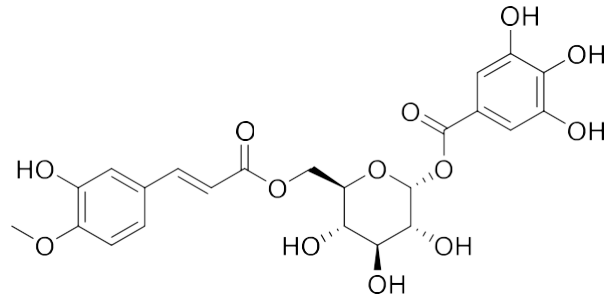


図9クマリンAの構成図

5 クマリンA対NF- β 炎症因子影響の試験

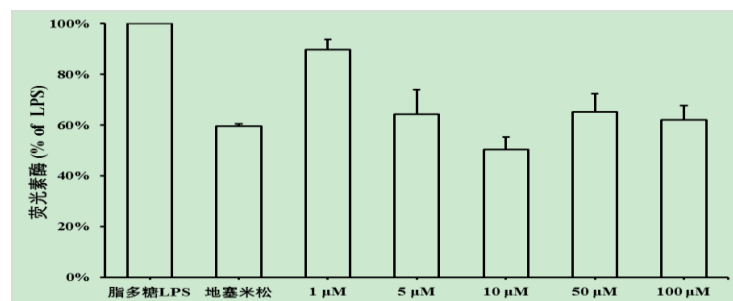
NF- β 炎症因子の影響の実験には、以下の手順が含まれる。

(1) RAW264.7細胞の培養：37°C、5%CO₂及び飽和湿度条件下で、細胞をDMEM培地（10%熱不活性化ウシ胎児血清、100 U/mLペニシリン及び100 μ m/mLストレプトマイシン）。

(2) RAW264.7細胞を5 \times 10⁴/mLを24ウェルプレートに播種し、細胞を約60%合流まで培養した後、JetPrimeトランスフェクションキットを用いてNF- β プラスミドトランスフェクション、培地を空白対照として、デキサメタゾン（20 μ M）は陽性対照である、試料は異なる濃度のクマリンAであった。対照とサンプルをそれぞれNF- β プラスミドトランスフェクションしたRAW264.7細胞に、3時間前処理を行い、リポ多糖（1 μ g/mL）を加えて炎症発生を誘導した。各グループに3つの複孔培養を行い、実験を3回繰り返した。

(3) 24時間後に細胞蛋白を抽出し、蛍光酵素を用いて遺伝子検出法による蛍光蛋白及び総蛋白の比率を報告する。

結果：図10に示すように、異なる濃度のクマリンAはすべて抑制NF- β 炎症因





子の作用。クマリンAが10 μ Mの場合、NF- κ B炎症因子の活性が最もよい。

図10リポ多糖LPSにより誘導される炎症因子NF- κ B抑制活性

6 コラーゲン因子COL1A1の遺伝子発現に対するケラチンAの影響試験

コラーゲン因子COL1A1の遺伝子発現に及ぼすクマリンAの影響の実験には、以下の手順が含まれる：



(1) 培養HaCaT（細胞ヒト永久生化学表皮細胞）：37°C、5%CO₂及び飽和湿度条件下で、細胞をDMEM培地（10%熱不活性化ウシ胎児血清、100 U/mL ペニシリン及び100 µm/mLストレプトマイシン）。

(2) HaCaT細胞（ヒト永生化表皮細胞）を細胞濃度5×10⁵個/mLの懸濁液を6ウェルプレートに播種した。CO₂培養箱（5%CO₂、37°C）に入れて24時間培養した後、それぞれ異なる濃度のクマリンAを加えた。24時間培養を続けた後、細胞を集めてmRNAを抽出した。

(3) RNA抽出：24時間後、培養液を吸引し、RNAzol RNA抽出試薬を利用して細胞のRNAを抽出し、その後NanodropでRNAの濃度を測定した。その後、オリゴ（dT）、dNTP、5 X first strand buffer、組換えリボヌクレアーゼ阻害剤（RNaseOUT Inhibitor）、ジチオカルバノール（DTT）及びマウス白血病逆転写酵素（M-MLV）を再利用して、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（rt-PCR、Real-time Polymerase Chain Reaction）を行うためにRNAをcDNAに逆転写した。

(4) リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応：蛍光染料を用いて検出し、サンプル中の標的遺伝子を定量化する

（COL 1 A 1 遺伝子）数の技術であり、この技術により、技術者は異なる容量のオリフィスプレートを使用して、同じ時間に複数の反応を検出することができる。各反応において、cDNAサンプル、上流プライマー、下流プライマー及びSybrGreen蛍光染色剤を添加し、プライマー配列は以下の通りである：
COL 1 A 1 F-プライマー5'-TCT GCG ACA ACG GCA AGG TG-3'、COL 1 A 1 R-プライマー5'-GCC GGT TTG

GT-3'、LightCyclerを再利用[®]480細胞の異なる薬物下での細胞遺伝子発現の変化を検出する。結果：図11の異なる濃度のソトキシナはCOL 1 A 1 遺伝子発現を促進す



ることができ、その中で角

豆樹素Aは10 μ MでコラーゲンCOL1A1遺伝子の発現活性を促進するのが最もよい。

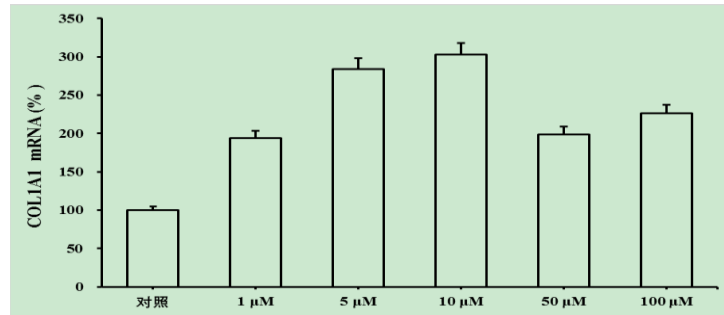


図11 COL1A1遺伝子発現に対する異なる濃度のクマリンAの影響